

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

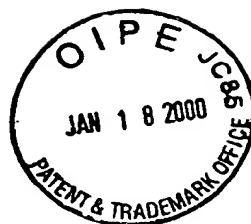
**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02240565 A**(43) Date of publication of application: **25.09.90**

(51) Int. Cl.

**G01N 31/00**  
**C12M 1/38**  
**// C12N 1/20**  
**C12N 5/00**

(21) Application number: **01059720**(71) Applicant: **HITACHI LTD**(22) Date of filing: **14.03.89**

(72) Inventor: **FUKUZONO SHINICHI**  
**SHIMIZU NORIO**

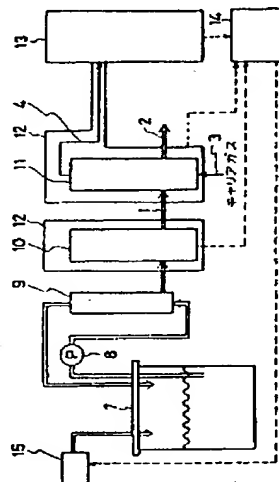
(54) **ANALYSIS, ANALYSIS APPARATUS, CULTURE METHOD, AND CULTURE DEVICE FOR DISSOLVED COMPONENT IN CULTURE SOLUTION**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To allow the analysis in real time within a short period of time with high accuracy by adjusting the pH of a culture solution to a set value, then evaporating the dissolved components in the culture solution and analyzing the evaporated dissolved components.

**CONSTITUTION:** The supernatant of the culture solution is sampled by a sampling pump 8 and a filter device 9 of a cross flow system from the culture solution 7 and a pH control agent is dropped 10 by an electric signal. While the flow rate of gas is adjusted in an evaporating device 11, the pH is controlled and the supernatant liquid is brought into contact with the carrier gas and the dissolved components are separated from the supernatant liquid into the carrier gas. The temp. is kept 12 at a set temp. during the above-mentioned stages. The dissolved components which are evaporated are subjected to measurement 13 of the mass analysis value and the supply rate of the culture medium is determined from this value by a culture controller 14. The supply rate of the medium is thus controlled 15. Since the continuous analysis of the dissolved components of the culture solution are enabled in a short period of time with the high accuracy, the analysis in the real time is possible and the efficient culture is executed when the culture conditions are controlled in accordance with the analysis value.

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&amp;Japio



## ⑫ 公開特許公報(A) 平2-240565

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成2年(1990)9月25日  
 G 01 N 31/00 GAB V 8506-2C  
 C 12 M 1/38 8717-4B  
 // C 12 N 1/20 A 8515-4B  
 5/00 8515-4B C 12 N 5/00 D  
 審査請求 未請求 請求項の数 12 (全5頁)

⑭ 発明の名称 培養液溶存成分の分析方法、分析装置、培養方法、及び、培養装置

⑯ 特 願 平1-59720

⑰ 出 願 平1(1989)3月14日

⑱ 発 明 者 福 蘭 真 一 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内  
 ⑲ 発 明 者 清 水 範 夫 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内  
 ⑳ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地  
 ㉑ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

培養液溶存成分の分析方法、分析装置、培養方法、及び、培養装置

## 2. 特許請求の範囲

1. 培養液の pH を設定値に調節した後、前記培養液中の溶存成分を気化せしめ、ついで、前記気化した溶存成分を分析することを特徴とする培養液溶存成分の分析方法。

2. 気化した溶存成分の分析が質量分析計による分析であることを特徴とする請求項1記載の培養液溶存成分の分析方法。

3. 培養液溶存成分の気化を、培養液をキャリアガスに接触せしめることにより行うことを特徴とする請求項1又は請求項2記載の培養液溶存成分の分析方法。

4. 培養液溶存成分の分析対象が有機酸であることを特徴とする請求項1乃至請求項3のいずれかの項記載の培養液溶存成分の分析方法。

5. 有機酸が酢酸であることを特徴とする請求項

4 記載の培養液溶存成分の分析方法。

6. 培養槽より培養液を採取する手段、採取した培養液の pH を調節する手段、pH を調節した培養液より溶存成分を気化する手段、及び、気化した溶存成分を分析する手段を具備することを特徴とする培養液溶存成分の分析装置。

7. 気化した溶存成分を分析する手段が質量分析計であることを特徴とする請求項6記載の培養液溶存成分の分析装置。

8. 採取した培養液の pH を調節する手段内に、pH を調節した培養液より溶存成分を気化する手段を併設したことを特徴とする請求項6又は請求項7記載の培養液溶存成分の分析装置。

9. 微生物又は動植物細胞の培養方法において、培養液の pH を設定値に調節した後、前記培養液の溶存成分を気化せしめ、気化した溶存成分を分析し、得られた分析値に基づいて培養条件を制御することを特徴とする微生物又は動植物細胞の培養方法。

10. 培養条件の制御を、培養基質の供給量の制御

によって行うことを特徴とする請求項9記載の微生物又は動植物細胞の培養方法。

11. 培養槽より培養液を採取する手段、採取した培養液のpHを調節する手段、pHを調節した培養液より溶存成分を気化する手段、気化した溶存成分を分析する手段、及び、培養液溶存成分の分析値に基づいて培養条件を制御する制御手段を具備することを特徴とする微生物又は動植物細胞の培養装置。

12. 培養条件を制御する制御手段が培養基質の供給量を制御することを特徴とする請求項11記載の微生物又は動植物細胞の培養装置。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (産業上の利用分野)

本発明は培養液中に溶存する成分を分析する分析方法及び分析装置、さらに微生物又は動植物細胞の培養方法及び培養装置に係る。

#### (従来の技術)

近年、細胞の培養において培養液中に溶存する成分、例えば細胞の代謝物や供給する基質などを

連続分析する点については配慮がなされておらず、効率的に細胞培養を行うための溶存成分分析が難しいという問題があった。

本発明の目的は、微生物又は動植物細胞を培養するに際し、培養槽から採取した培養液中の溶存成分を高精度で短時間に連続分析する方法及び装置、及び効率的に細胞培養を行うための培養方法及び装置を提供することである。

#### (課題を解決するための手段)

上記目的を達成するための本発明は、培養液のpHを設定値に調節した後、前記培養液中の溶存成分を気化せしめ、ついで、前記気化した溶存成分を分析することを特徴とする培養液溶存成分の分析方法である。そして、上記溶存成分の分析は好ましくは質量分析計により行われ、又、培養液溶存成分の気化は好ましくは培養液をキャリアガスに接触させることにより行うことができる。本発明の分析方法は分析対象が有機酸、特に酢酸である場合に有用である。

前記分析方法に用いる分析装置は培養槽より培

養液を採取する手段、採取した培養液のpHを調節する手段、pHを調節した培養液より溶存成分を気化する手段、及び、気化した溶存成分を分析する手段を具備することを特徴とする装置である。気化した溶存成分を分析する手段は好ましくは質量分析計である。前記分析装置においては、採取した培養液のpHを調節する手段内に、pHを調節した培養液より溶存成分を気化する手段を併設しても良い。

更に本発明は、微生物又は動植物細胞の培養方法において、培養液のpHを設定値に調節した後、前記培養液の溶存成分を気化せしめ、気化した溶存成分を分析し、得られた分析値に基づいて培養条件を制御することを特徴とする微生物又は動植物細胞の培養方法及び培養槽より培養液を採取する手段、採取した培養液のpHを調節する手段、pHを調節した培養液より溶存成分を気化する手段、気化した溶存成分を分析する手段、及び、培養液溶存成分の分析値に基づいて培養条件を制御する制御手段を具備することを特徴とする培養装

置である。また培養液をそのまま分析装置に導入すると、目的とする易揮発性成分以外の成分やその分解物などが検出され、分析が難しくなる可能性がある。そこで、目的成分を分離してから導入することが好ましく、これを目的とした従来技術としてGC(ガスクロマトグラフ)質量分析計やLC(液体クロマトグラフ)質量分析計が開発されているが、短時間で連続測定することは困難である。

#### (発明が解決しようとする課題)

上記従来技術は高精度で短時間に溶存成分を連

続分析する点については配慮がなされておらず、効率的に細胞培養を行うための溶存成分分析が難しいという問題があった。

更に本発明は、微生物又は動植物細胞の培養方法において、培養液のpHを設定値に調節した後、前記培養液の溶存成分を気化せしめ、気化した溶存成分を分析し、得られた分析値に基づいて培養条件を制御することを特徴とする微生物又は動植物細胞の培養方法及び培養槽より培養液を採取する手段、採取した培養液のpHを調節する手段、pHを調節した培養液より溶存成分を気化する手段、気化した溶存成分を分析する手段、及び、培養液溶存成分の分析値に基づいて培養条件を制御する制御手段を具備することを特徴とする培養装

置である。

以下、本発明の詳細を説明する。

本発明の分析方法及び分析装置を適用しうる、培養液中の分析すべき揮発性溶存成分として、具体的には有機酸、炭酸ガス、アンモニア等が挙げられ、例えば培養液が大腸菌の培養液である場合は酢酸、アンモニアなどである。

分析すべき目的成分がメタノールやエタノールなど揮発性の高い成分である場合は、容易に培養排気ガス中に拡散するので、排気ガスをそのまま質量分析計等の分析手段に導入することで測定が可能である。これに対し、有機酸、特に酢酸を目的成分とした場合、大腸菌の一般的な培養条件である30~40℃、pH 7前後では排気ガス中にはほとんど拡散しないため、排気ガスをそのまま質量分析計等の分析手段に導入するだけでは測定が困難である。

そこで、本発明においては増殖阻害物質である酢酸等の揮発性溶存成分を測定するために、培養液又は細胞を除去した培養上清液を設定pH値に

望ましくは2~3にするのが良い。pHを調節するために培養槽より抜き出す液量は培養槽内の液量への影響を少なくするために10ml/min以下、望ましくは1ml/min以下が良い。

pHを調節した培養液より溶存成分を気化する方法としては、加熱する方式やキャリアガスにより気化させる方式や両方式を併用する方式などがあるが、気化効率を高くするには両方式を併用するのが良い。加熱温度は高い方が良いが、温度制御や分析精度の点から50~90℃の範囲が採用できる。キャリアガスは目的成分とは分子量の異なるガスが用いられるが、ヘリウムガスやアルゴンガスなどの不活性ガスが好ましい。

キャリアガスにより揮発させる方式を用いた気化装置を構成する気化容器の例を第2図に示す。

(A)は液入口1から液出口2へpHを調節した培養液をオーバーフロー方式で流し、キャリアガスを送気入口3から液中に通気し、液上部の気相部から送気口4を通過する容器である。

(B)は(A)と同様の通液方式であるが、液相底部が

調節した後、培養液中の溶存成分を気化せしめ、分析することにより迅速かつ連続的に測定するものである。

そのための分析装置は、培養槽より培養液を採取する手段、採取した培養液のpHを調節する手段、pHを調節した培養液より溶存成分を気化する手段、及び、気化した溶存成分を分析する手段を具備することを特徴とする。以下に、それぞれの手段について説明する。

培養槽より培養液を採取する手段としては、ポンプ又は圧力で抜き出す方式、又は抜き出した培養液から細胞を除くために遠心分離装置やセラミック筒などを設けた濾過装置を用いて採取する方式などが採用できる。

採取した培養液のpHを調節する手段としては、pH調節器を用いる方式や、一定量の酸又はアルカリを自動的に注入する方式などが採用できる。

pHの設定値は、目的とする測定成分によって異なるが、例えば酢酸を測定成分とする場合には培養液中の酢酸塩を酢酸にするためにpHを6以下、

例えば疎水性多孔膜やガラス濾過板などから成る細孔板5で構成され、細孔板5の下方から上方へ向けてキャリアガスを通気する容器である。

(C)は液入口1から液出口2へ通液し、これに逆流するように送気入口3から送気出口4へ通気する容器である。

(D)は(C)と同様な容器内に多段式に板を配置した容器である。

(E)は(C)と同様な容器内に例えばセラミックス又はステンレスから成るハニカム構造状の筒又はガラスビーズなど粒子状の成形物などの挿入物6を入れた容器である。

また、pH調整装置と溶存成分の気化装置は別々に設けてもよいが、pH調整と溶存成分の気化を同一容器において行ってもよい。

気化した溶存成分を分析する手段としては、感度、測定時間などの点から質量分析計が好ましい。しかし、目的成分が一種類の場合は非常に感度の高い半導体センサーなどを用いることも可能である。

本発明の微生物又は動植物細胞の培養方法は、前述の溶存成分分析方法により得られた分析値に基づいて培養条件を制御しながら微生物又は動植物細胞を培養することを特徴とする。また、本発明の微生物又は動植物細胞の培養装置は、前述の分析装置及びそれにより得られた分析値に基づいて培養条件を制御する手段を具備している。

本発明培養装置における溶存成分の分析値を用いて培養を制御する手段としては、分析値から培養基質の供給量をミニコンピュータなどで解析する方式、例えば酢酸濃度を指標として流加用培地の流加量を増減させて培養液中の酢酸濃度を制御し、酢酸による増殖阻害を防止する培養制御方式、又は溶存成分の分析値がある設定値に達した場合、遠心分離又は濾過操作などにより培地交換を行う方式などが採用される。

なお、上記各手段から構成される装置の送液配管及び送気配管は培養液の採取から溶存成分の分析までに要する時間を最小限にするために可能な限り短かくかつ細いことが望ましい。

#### 〔実施例〕

本発明の実施例を培養装置の系統図を示す第1図により説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるものではない。

培養槽7から培養液を採取する手段として培養液の採取用ポンプ8とクロスフロー方式の濾過装置9で培養上清液を採取し、pHを調節する手段としてpH調節剤の滴加量を電気信号で出力できる装置が設けられたpH調節装置10により上清液のpHを設定値に調節し、溶存成分を気化する手段としてガス流量を電気信号で出力できる流量調節装置が設けられた気化装置11内でpHを調節した上清液をキャリアガスと接触させることにより溶存成分を上清液からキャリアガス中に分離し、例えば温度調節装置を設けた保温装置12で上記工程を設定温度に保ち、気化した成分を分析する手段として分析値を電気信号で出力できる質量分析計13で気化した溶存成分を測定する。溶存成分の分析値を用いて培養を制御する手段としては、pH調節装置10や気化装置11から出力された信号

#### 〔作 用〕

本発明の分析方法において、培養槽より培養液を採取することにより、目的とする溶存成分を培養系外へ取り出すことで培養条件を変化させることなく溶存成分を分析するに好適な条件環境を作り出せ、採取した培養液のpHを調節することにより溶存成分を培養液から解離させ、pHを調整した培養液から溶存成分を気化させることにより溶存成分を培養液から分離し、分析装置へ導入することができる。

その際、目的成分に適したpHや温度を設定することにより、目的以外の他の成分の質量分析計への導入を少なくし、他の成分の分解物による妨害を低減することができる。また試料を短時間であつ連続的に分析手段に導入することができるため、実時間における培養液溶存成分の測定が可能となる。従って、本発明の分析方法を用いて培養液中の増殖阻害物質の測定を実時間でを行い、それに基づいて培養条件を制御すれば増殖阻害を防止し、効率的な培養を達成できる。

を用いて質量分析計13から出力された測定値を解析できる装置を設けた培養制御装置14により、溶存成分の分析値から培養基質の供給量を決定し電気信号により基質供給装置15へ出力し、基質の供給量を制御することにより行われる。

#### 〔発明の効果〕

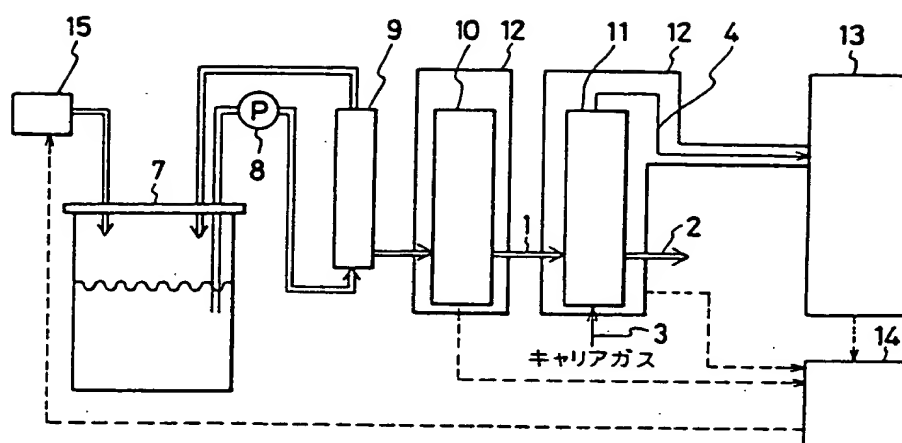
本発明によれば、培養液溶存成分の分析を高精度で短時間に連続分析して実時間における分析が可能となり、微生物又は動植物細胞の培養において、この分析値に基づいて培養条件を制御すれば効率的な培養を行うことができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例を表わす装置の系統図、第2図(A)~(D)は本発明装置における気化容器の断面図である。

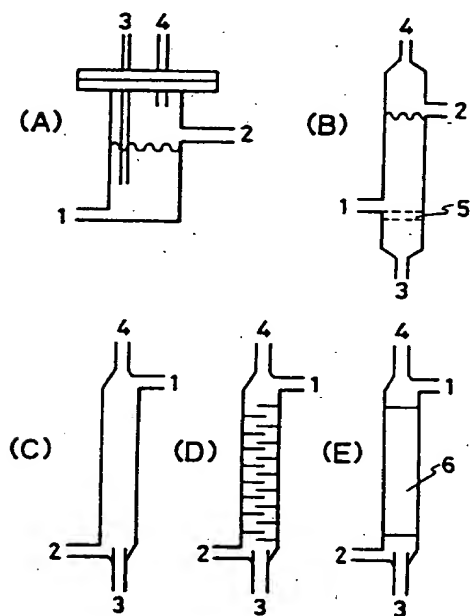
1…液入口、2…液出口、3…送気入口、4…送気出口、5…細孔板、6…挿入物、7…培養槽、8…採取用ポンプ、9…濾過装置、10…pH調節装置、11…気化装置、12…保温装置、13…質量分析計、14…培養制御装置、15…基質供給装置

第 1 図



- |          |           |           |
|----------|-----------|-----------|
| 7 培養槽    | 10 pH調節装置 | 13 質量分析計  |
| 8 採取用ポンプ | 11 気化装置   | 14 培養制御装置 |
| 9 濾過装置   | 12 保温装置   | 15 基質供給装置 |

第 2 図



- |        |        |
|--------|--------|
| 1 液入口  | 4 送気出口 |
| 2 液出口  | 5 細孔板  |
| 3 送気入口 | 6 撹入物  |